

日本国特許庁 25.6.2004  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2004年 3月12日

RECEIVED	
12 AUG 2004	
WIPO	PCT

出願番号 Application Number: 特願2004-070497

[ST. 10/C]: [JP2004-070497]

出願人 Applicant(s): 杉山 治夫

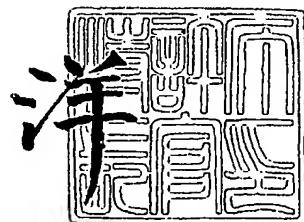


**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 7月30日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 193662  
【提出日】 平成16年 3月12日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 G01N 33/53  
【発明者】  
  【住所又は居所】 大阪府箕面市船場西 2-19-30  
  【氏名】 杉山 治夫  
【特許出願人】  
  【識別番号】 595090392  
  【住所又は居所】 大阪府箕面市船場西 2-19-30  
  【氏名又は名称】 杉山 治夫  
【代理人】  
  【識別番号】 100068526  
  【弁理士】  
  【氏名又は名称】 田村 恭生  
  【電話番号】 06-6949-1261  
  【ファクシミリ番号】 06-6949-0361  
【選任した代理人】  
  【識別番号】 100103230  
  【弁理士】  
  【氏名又は名称】 高山 裕貢  
  【電話番号】 06-6949-1261  
  【ファクシミリ番号】 06-6949-0361  
【選任した代理人】  
  【識別番号】 100087114  
  【弁理士】  
  【氏名又は名称】 斎藤 みの里  
  【電話番号】 06-6949-1261  
  【ファクシミリ番号】 06-6949-0361  
【先の出願に基づく優先権主張】  
  【出願番号】 特願2003-184436  
  【出願日】 平成15年 6月27日  
【手数料の表示】  
  【予納台帳番号】 223643  
  【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
  【物件名】 特許請求の範囲 1  
  【物件名】 明細書 1  
  【物件名】 図面 1  
  【物件名】 要約書 1  
  【包括委任状番号】 0203207

## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項1】

以下の工程（a）、（b）および（c）：

- (a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、
  - (b) 前記（a）の生体試料中に存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、
  - (c) 前記（b）の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチン応答性を判断する工程、
- を含む、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法。

## 【請求項2】

WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペントマー法、エリススポット法、リアルタイムRT-PCR法および限界希釈法のいずれかの方法により測定する、請求項1記載の選択方法。

## 【請求項3】

HLAテトラマー法により測定する、請求項2記載の選択方法。

## 【請求項4】

以下の工程（a）、（b）、（c）および（d）：

- (a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、
  - (b) WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーと、前記（a）の生体試料とを接触させる工程、
  - (c) HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、
  - (d) 前記（c）の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチン応答性を判断する工程、
- を含む、請求項3記載の選択方法。

## 【請求項5】

請求項4に記載の工程（c）が、CD8陽性またはCD8／CD3陽性のCTL前駆細胞中のHLAテトラマー結合細胞の割合を測定することにより行われる、請求項4記載の選択方法。

## 【請求項6】

HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、請求項4または5記載の選択方法。

## 【請求項7】

WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：2）、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：3）、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu（配列番号：4）およびArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe（配列番号：5）より選択される、請求項4～6いずれか記載の選択方法。

## 【請求項8】

フローサイトメトリーを用いて行われる請求項1～7いずれか記載の選択方法。

## 【請求項9】

WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量が、健常人の値と比較して1.5倍以上高いことを指標としてWT1ワクチン応答性を判断する、請求項1～8いずれか記載の選択方法。

## 【請求項10】

以下の工程（a）～（d）：

- (a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、
- (b) 前記（a）の生体試料に複数のWT1ワクチンの標的分子をそれぞれ適用し、
- (c) 前記（b）の生体試料中それぞれに存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定し、それぞれ比較する工程、

(d) 前記(c)の測定結果に基づいて、その患者に有効なWT1ワクチンの標的分子を同定する工程、  
を含む、患者固有のWT1ワクチン標的分子の同定方法。

【請求項11】

WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペントマー法、エリススポット法、リアルタイムRT-PCR法および限界希釈法のいずれかの方法により測定する、請求項10記載の同定方法。

【請求項12】

HLAテトラマー法により測定する、請求項11記載の同定方法。

【請求項13】

以下の工程(a)～(d)：

- (a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、
- (b) WT1由来の複数の癌抗原ペプチドを含有する複数のHLAテトラマーと、前記(a)の生体試料とをそれぞれ接触させる工程、
- (c) HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量をそれぞれ測定し、比較する工程、
- (d) 前記(c)の測定結果に基づいて、その患者に有効なWT1由来の癌抗原ペプチドを同定する工程、  
を含む、請求項12記載の同定方法。

【請求項14】

請求項13に記載の工程(c)が、CD8陽性またはCD8／CD3陽性のCTL前駆細胞中でのHLAテトラマー結合細胞の割合を測定することにより行われる、請求項13記載の同定方法。

【請求項15】

HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、請求項13または14記載の同定方法。

【請求項16】

WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(配列番号：4)およびArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe(配列番号：5)より選択される、請求項13～15いずれか記載の同定方法。

【請求項17】

フローサイトメトリーにより行われる請求項10～16いずれか記載の同定方法。

【請求項18】

WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペントマーを成分とする、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択のための臨床検査薬。

【請求項19】

HLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペントマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、請求項18記載の臨床検査薬。

【請求項20】

WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(配列番号：4)およびArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe(配列番号：5)より選択される、請求項18または19に記載の臨床検査薬。

【請求項21】

請求項18～20いずれか記載の臨床検査薬を含有するキット。

【請求項22】

請求項10～17いずれか記載の患者固有のWT1ワクチン標的分子の同定方法により同定された標的分子を含有する、患者固有の癌を処置するための当該患者用の医薬組成物。

#### 【請求項2・3】

以下の工程（a）、（b）および（c）：

- (a) CTLを含む生体試料をWT1ワクチン投与後の患者より単離する工程、
- (b) 前記（a）の生体試料中に存在するWT1特異的なCTLの存在頻度または量を測定する工程、
- (c) 前記（b）の測定結果をWT1ワクチン投与前のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチンによる治療の適合性を判断する工程、  
を含む、該患者における該WT1ワクチンの適合性を判定する方法。

#### 【請求項2・4】

WT1特異的なCTLの存在頻度または量を、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペントマー法、エリスポット法、リアルタイムRT-PCR法および限界希釈法のいずれかの方法により測定する、請求項2・3記載の判定方法。

#### 【請求項2・5】

HLAテトラマー法により測定する、請求項2・4記載の判定方法。

#### 【請求項2・6】

以下の工程（a）、（b）、（c）および（d）：

- (a) CTLを含む生体試料をWT1ワクチン投与後の患者より単離する工程、
- (b) WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーと、前記（a）の生体試料とを接触させる工程、
- (c) HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTLの存在頻度または量を測定する工程、
- (d) 前記（c）の測定結果をWT1ワクチン投与前のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチンによる治療の適合性を判断する工程、  
を含む、請求項2・5記載の判定方法。

#### 【請求項2・7】

請求項2・6に記載の工程（c）が、CD8陽性またはCD8／CD3陽性のCTL中のHLAテトラマー結合細胞の割合を測定することにより行われる、請求項2・6記載の判定方法。

#### 【請求項2・8】

HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、請求項2・6または2・7記載の判定方法。

#### 【請求項2・9】

WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：2）、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：3）、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu（配列番号：4）およびArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe（配列番号：5）より選択される、請求項2・6～2・8いずれか記載の判定方法。

#### 【請求項3・0】

フローサイトメトリーを用いて行われる請求項2・3～2・9いずれか記載の判定方法。

#### 【請求項3・1】

WT1特異的なCTLの存在頻度または量が、WT1ワクチン投与前の値と比較して1.5倍以上高いことを指標としてWT1ワクチンによる治療が適しているか否かを判断する、請求項2・3～3・0いずれか記載の判定方法。

#### 【請求項3・2】

WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペントマーを成分とする、WT1ワクチンの適合性の判定のための臨床検査薬。

#### 【請求項3・3】

HLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペントマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、請求項32記載の臨床検査薬。

【請求項34】

WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：2）、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：3）、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu（配列番号：4）およびArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe（配列番号：5）より選択される、請求項32または33に記載の臨床検査薬。

【請求項35】

請求項32～34いずれか記載の臨床検査薬を含有するキット。

【書類名】明細書

【発明の名称】WT1ワクチン適応患者の選択方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、WT1特異的CTL前駆細胞の頻度を指標とした、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法などに関する。

【背景技術】

【0002】

WT1遺伝子 (Wilms' tumor gene 1) は、小児の腎腫瘍であるWilms腫瘍の原因遺伝子の1つとして同定された（非特許文献1および2を参照）。WT1遺伝子は転写因子WT1をコードしており、WT1は細胞の増殖・分化・アポトーシス及び臓器の形成などに関する重要な働きをする（非特許文献3を参照）。当初、WT1遺伝子は、癌抑制遺伝子と位置付けられていたが、その後の研究により白血病及び肺癌や乳癌を含む種々の固体癌で発現が認められ、むしろ癌の増殖を促進する癌遺伝子としての作用を有することが示された。また、WT1由来のペプチドでHLA-A\*0201陽性またはHLA-A\*2402陽性の末梢血単核球をin vitroで刺激することにより、ペプチド特異的な細胞傷害性T細胞（CTL）が誘導され、これらのCTLは、内因性にWT1を発現する白血病や固体癌の癌細胞を傷害することが示された。これらの結果より、WT1は癌免疫療法の有望な標的分子であることが示された（非特許文献4を参照）。

抗原ペプチド特異的なCTLをin vitroで定量する方法としては、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法（非特許文献5を参照）、HLAペントマー法、ELISPOT法（非特許文献6を参照）、リアルタイムRT-PCR法（非特許文献7を参照）、限界希釈法（非特許文献8を参照）などが知られている。HLA-テトラマーは、HLA $\alpha$ 鎖と $\beta_2$ ミクログロブリンをペプチドと会合させた複合体（HLAモノマー）をビオチン化し、蛍光標識したアビジョンに結合させることにより4量体化して作製する。HLAテトラマーでペプチド特異的CTLを染色し、フローサイトメーターで解析することによりCTLの頻度を測定することができる。HLAモノマー法、HLAダイマー法及びHLAペントマー法も同様の原理に基づきCTLの頻度を測定することができる。

ワクチンによる刺激前のCTLをCTL前駆細胞（プリカーサー）と称している。特定の癌抗原に対するCTL前駆細胞の存在頻度が高ければ、癌ワクチンとしてその抗原を投与した場合に効率良く特異的なCTLが誘導され、癌ワクチン療法による奏効が得られやすいと考えられる。すなわち、特定の癌抗原に特異的なCTL前駆細胞の存在頻度の高い患者をワクチン投与前に選択することができるれば、その癌抗原を用いたより効果的な治療を行うことが可能となる。

【0003】

しかしながら、メラノーマ患者の末梢血単核球（PBMC）を用いたHLAテトラマーによるCTL前駆細胞の頻度測定についてはいくつかの報告がなされているが、癌抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞の頻度は1%以下の低値であることが示されている（非特許文献9および10を参照）。このようなことから、抗原に対するCTL前駆細胞の存在頻度は一般的に低いと考えられており、CTL前駆細胞の存在頻度を指標として癌ワクチンの適応患者を選択することは困難であると考えられていた。

【0004】

【非特許文献1】Cell 60: 509, 1990

【非特許文献2】Nature 343: 774, 1990

【非特許文献3】Int. Rev. Cytol. 181: 151, 1998

【非特許文献4】Int. J. Hematol 76: 127, 2002

【非特許文献5】Science 274: 94, 1996

【非特許文献6】J. Immunol. Methods 110: 29, 1988

【非特許文献7】J. Immunol. Methods 210: 195, 1997

【非特許文献8】 Br. J. Cancer 77: 1907, 1998

【非特許文献9】 J. Immunother. 24: 66, 2001

【非特許文献10】 Hum. Gene. Ther. 13: 569, 2002

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、WT1特異的CTL前駆細胞の頻度を指標とした、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法などを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は、WT1由来の癌抗原ペプチドを用いてHLAテトラマーを作製し、造血器悪性腫瘍及び肺癌の患者のワクチン投与前のCTL前駆細胞の頻度を測定したところ、驚くべきことに、健常人に比べて、従来にない高い頻度でCTL前駆細胞（WT1特異的なCTL前駆細胞）が存在していることを見出した。このことから癌抗原WT1に関しては、WT1特異的なCTL前駆細胞の頻度を指標として、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択やWT1ワクチンの標的分子の同定を行えることが明らかとなった。

さらに本発明者は、WT1由来の癌抗原ペプチドによる治療実施中の患者におけるWT1特異的CTLの頻度を測定したところ、ペプチド投与前に対するペプチド投与後のCTL頻度の増加と治療効果とが相関していることを見出した。

本発明は、以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

【0007】

すなわち本発明は、

(1) 以下の工程 (a)、(b) および (c) :

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

(b) 前記 (a) の生体試料中に存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、

(c) 前記 (b) の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチン応答性を判断する工程、

を含む、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法；

(2) WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペントマー法、エリススポット法、リアルタイムRT-PCR法および限界希釈法のいずれかの方法により測定する、前記 (1) 記載の選択方法；

(3) HLAテトラマー法により測定する、前記 (2) 記載の選択方法；

(4) 以下の工程 (a)、(b)、(c) および (d) :

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

(b) WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーと、前記 (a) の生体試料とを接触させる工程、

(c) HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、

(d) 前記 (c) の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチン応答性を判断する工程、

を含む、前記 (3) 記載の選択方法；

(5) 前記 (4) に記載の工程 (c) が、CD8陽性またはCD8／CD3陽性のCTL前駆細胞中のHLAテトラマー結合細胞の割合を測定することにより行われる、前記 (4) 記載の選択方法；

(6) HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、前記 (4) または (5) 記載の選択方法、

(7) WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、Arg Met Phe Pro

Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)およびArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5)より選択される、前記(4)～(6)いずれか記載の選択方法；

(8) フローサイトメトリーを用いて行われる前記(1)～(7)いずれか記載の選択方法；

(9) WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量が、健常人の値と比較して1.5倍以上高いことを指標としてWT1ワクチン応答性を判断する、前記(1)～(8)いずれか記載の選択方法；

(10) 以下の工程(a)～(d)：

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

(b) 前記(a)の生体試料に複数のWT1ワクチンの標的分子をそれぞれ適用し、

(c) 前記(b)の生体試料中それぞれに存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定し、それぞれ比較する工程、

(d) 前記(c)の測定結果に基づいて、その患者に有効なWT1ワクチンの標的分子を同定する工程、

を含む、患者固有のWT1ワクチン標的分子の同定方法。

#### 【0008】

(11) WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペントマー法、エリススポット法、リアルタイムRT-PCR法および限界希釈法のいずれかの方法により測定する、前記(10)記載の同定方法；

(12) HLAテトラマー法により測定する、前記(11)記載の同定方法；

(13) 以下の工程(a)～(d)：

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

(b) WT1由来の複数の癌抗原ペプチドを含有する複数のHLAテトラマーと、前記(a)の生体試料とをそれぞれ接觸させる工程、

(c) HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量をそれぞれ測定し、比較する工程、

(d) 前記(c)の測定結果に基づいて、その患者に有効なWT1由来の癌抗原ペプチドを同定する工程、

を含む、前記(12)記載の同定方法；

(14) 前記(13)に記載の工程(c)が、CD8陽性またはCD8／CD3陽性のCTL前駆細胞中でのHLAテトラマー結合細胞の割合を測定することにより行われる、前記(13)記載の同定方法；

(15) HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、前記(13)または(14)記載の同定方法；

(16) WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)およびArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5)より選択される、前記(13)～(15)いずれか記載の同定方法；

(17) フローサイトメトリーにより行われる前記(10)～(16)いずれか記載の同定方法；

(18) WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペントマーを成分とする、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択のための臨床検査薬；

(19) HLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペントマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、前記(18)記載の臨床検査薬；

(20) WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)およびArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe

- (配列番号：5) より選択される、前記(18)または(19)に記載の臨床検査薬；  
(21) 前記(18)～(20)いずれか記載の臨床検査薬を含有するキット；  
(22) 前記(10)～(17)いずれか記載の患者固有のWT1ワクチン標的分子の同定方法により同定された標的分子を含有する、患者固有の癌を処置するための当該患者用の医薬組成物；  
(23) 以下の工程(a)、(b)および(c)：  
(a) CTLを含む生体試料をWT1ワクチン投与後の患者より単離する工程、  
(b) 前記(a)の生体試料中に存在するWT1特異的なCTLの存在頻度または量を測定する工程、  
(c) 前記(b)の測定結果をWT1ワクチン投与前のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチンによる治療の適合性を判断する工程、  
を含む、該患者における該WT1ワクチンの適合性を判定する方法；  
(24) WT1特異的なCTLの存在頻度または量を、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペントマー法、エリススポット法、リアルタイムRT-PCR法および限界希釈法のいずれかの方法により測定する、前記(23)記載の判定方法；  
(25) HLAテトラマー法により測定する、前記(24)記載の判定方法；  
(26) 以下の工程(a)、(b)、(c)および(d)：  
(a) CTLを含む生体試料をWT1ワクチン投与後の患者より単離する工程、  
(b) WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーと、前記(a)の生体試料とを接触させる工程、  
(c) HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTLの存在頻度または量を測定する工程、  
(d) 前記(c)の測定結果をWT1ワクチン投与前のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチンによる治療の適合性を判断する工程、  
を含む、前記(25)記載の判定方法；  
(27) 前記(26)に記載の工程(c)が、CD8陽性またはCD8／CD3陽性的CTL中でのHLAテトラマー結合細胞の割合を測定することにより行われる、前記(26)記載の判定方法；  
(28) HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、前記(26)または(27)記載の判定方法；  
(29) WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(配列番号：4)およびArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe(配列番号：5)より選択される、前記(26)～(28)いずれか記載の判定方法；  
(30) フローサイトメトリーを用いて行われる前記(23)～(29)いずれか記載の判定方法；  
(31) WT1特異的なCTLの存在頻度または量が、WT1ワクチン投与前の値と比較して1.5倍以上高いことを指標としてWT1ワクチンによる治療が適しているか否かを判断する、前記(23)～(30)いずれか記載の判定方法；  
(32) WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペントマーを成分とする、WT1ワクチンの適合性の判定のための臨床検査薬；  
(33) HLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペントマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、前記(32)記載の臨床検査薬；  
(34) WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(配列番号：4)およびArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe(配列番号：5)より選択される、前記(32)または(33)に記載の臨床検査薬；な

らびに

(35) 前記(32)～(34)いずれか記載の臨床検査薬を含有するキット、に関する。

**【発明の効果】**

**【0009】**

本発明により、WT1特異的CTL前駆細胞の頻度を指標とした、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法や、その選択のための臨床検査薬などが提供される。本発明の選択方法により、よりWT1ワクチン療法による効果の期待される患者を選択することができ、適切な治療を施すことが可能となる。

**【発明を実施するための最良の形態】**

**【0010】**

本発明は、以下の工程(a)、(b)および(c)：

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

(b) 前記(a)の生体試料中に存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、

(c) 前記(b)の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチン応答性を判断する工程、

を含む、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法を提供する。

本発明においては、ワクチン投与前の癌患者において、従来にない高い頻度でWT1特異的なCTL前駆細胞が存在していることを見出した。従ってWT1特異的なCTL前駆細胞の量や頻度を指標として、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択を行うことができる。

**【0011】**

工程(a)における被験患者とは、癌の疑われる患者、若しくは癌患者を指す。具体的には、白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌が疑われる患者、若しくはこれらの癌に罹患した患者が例示される。

**【0012】**

工程(a)において被験患者より単離される生体試料は、CTL前駆細胞を含む限り特に制限はないが、血液、リンパ液またはこれらの培養物、血液から単離した末梢血単核球(PBMC)、若しくはT細胞が浸潤した組織などが例示される。生体試料は、そのまま使用することもできるし、希釈または濃縮して使用することもできる。好ましくはPBMCが用いられ、当該PBMCは通常のFicoll-Hypaqueの密度勾配遠心法などにより単離することができる。

**【0013】**

工程(b)において生体試料中に存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する手法は、CTLの存在頻度または量を測定できる従来公知の如何なる手法を用いても良い。具体的には、例えばHLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペントマー法、エリスポット法、リアルタイムRT-PCR法または限界希釈法などを用いることができる。

**【0014】**

ここでHLAテトラマー法とは、HLA抗原 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 2ミクログロブリンを目的抗原ペプチドと会合させた複合体(HLAモノマー)をビオチン化し、蛍光標識したアビジンに結合させることにより4量体化して作製したHLAテトラマーを用いて、抗原ペプチド特異的CTLを検出する方法である。具体的には、当該HLAテトラマーで抗原ペプチド特異的なCTLを染色し、フローサイトメーターで解析することにより当該CTLを定量することができる。このようなHLAテトラマーの製造方法およびそれを用いたCTLの検出方法は公知であり、例えば文献(Science 274: 94, 1996)に記載の方法に準じて行うことができる。

HLAモノマー法とは前記HLAテトラマーの製造において用いられるHLAモノマー(HLA抗原 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 2ミクログロブリン、抗原ペプチドの会合体をビオチン化したもの)を用い

て抗原ペプチド特異的CTLを検出する方法である。

HLAダイマー法とはHLA抗原 $\alpha$ 鎖とIg（イムノグロブリン、例えばIgG1）とを融合させ、これに $\beta$ 2ミクログロブリン、抗原ペプチドを結合させたHLAダイマーを用いて、抗原ペプチド特異的CTLを検出する方法である（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6671-6675(1993)）。HLAダイマーに結合した抗原ペプチド特異的CTLは、例えば標識抗IgG1抗体をIgG1に結合させることなどにより、検出することができる。

HLAペントマーマー法とは近年開発された手法であり、HLA抗原と抗原ペプチドとの複合体5分子がCoiled-Coilドメインを介して重合した5量体により、抗原ペプチド特異的CTLを検出する方法である。HLA抗原-抗原ペプチドの複合体を蛍光色素等で標識することができるため、HLAテトラマー法と同様にフローサイトメーター等で解析することができる（http://www.proimmune.co.uk/参照）。

以上に述べたHLAモノマー、ダイマー、テトラマーおよびペントマーマーはいずれも受託合成可能であり、例えばProImmune社やBD Biosciences社などに委託することにより合成することができる。

#### 【0015】

エリスポット法とは、活性化CTLが産生するIFN- $\gamma$ 、GM-CSF等のサイトカインに対する抗体をプレート上に固相化し、目的抗原若しくは目的抗原ペプチドで刺激した生体試料をプレートに添加し、前記固相化抗体に結合した生体試料中の活性化CTLが分泌したサイトカインを抗サイトカイン抗体でスポットとして検出することにより、生体試料中のCTLを検出する方法である。当該エリスポット法を用いたCTLの定量法は公知であり、例えば文献（J. Immunol. Methods 110: 29, 1988）に記載の方法に準じて行うことができる。

#### 【0016】

リアルタイムRT-PCR法とは、活性化CTLが産生するIFN- $\gamma$ 、GM-CSF等のサイトカインの遺伝子量をRT-PCRにより測定することにより、間接的に、目的抗原若しくは目的抗原ペプチド反応性のCTL頻度を測定する方法である。当該リアルタイムRT-PCR法を用いたCTLの定量法は公知であり、例えば文献（J. Immunol. Methods 210: 195, 1997）に記載の方法に準じて行うことができる。

#### 【0017】

限界希釈法とは、CTLを含む生体試料を細胞密度を変えてプレートに播種し、目的抗原若しくは目的抗原ペプチドで刺激しながら培養して、活性化CTLが産生するサイトカイン量や細胞傷害性を測定し、陽性ウェル数からCTL頻度を測定する方法である。当該限界希釈法を用いたCTLの定量法は公知であり、例えば文献（Br. J. Cancer 77: 1907, 1998）に記載の方法に準じて行うことができる。

以上のような公知のCTL定量法を用いることにより、WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定することができる。

#### 【0018】

工程（c）におけるWT1ワクチン応答性の判断は、工程（b）で得られた被験患者におけるWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量（以下被験患者値という）を、健常人のそれ（健常人値）と比較し、両者の違いを判定することによって行うことができる。この場合、健常人から単離・調製した生体試料（血液、リンパ液、PBMC等）が必要であるが、これらは癌に罹患していない人の生体試料を採取することによって、取得することができる。なお、ここでいう「健常人」とは、癌と診断されていない人をいう。

#### 【0019】

被験者値と健常人値との比較は、被験者の生体試料と健常人の生体試料を対象とした測定を並行して行うことで実施できる。並行して行わない場合は、複数（少なくとも2つ、好ましくは3以上、より好ましくは5以上）の健常人の生体試料を用いて均一な測定条件で測定して得られた健常人値の平均値または統計的中間値を比較に用いることができる。

#### 【0020】

被験患者においてWT1ワクチン応答性が高いか否かの判断は、被験者値が健常人値と比較して1.5倍以上、好ましくは2倍以上多いことを指標として行うことができる。すなわち

、被験者値が健常人値と比較して1.5倍以上、好ましくは2倍以上多ければ、WT1ワクチン応答性が高いと判断する。WT1ワクチン応答性が高いと判断された患者は、WT1ワクチンが適用可能、即ちWT1ワクチンによる治療を良好に適用できると判断される。

#### 【0021】

前記CTLの測定法のうち、手法の容易さおよび精度の観点から最も好ましいのはHLAテトラマー法である。すなわち本発明の選択方法の好ましい形態として、本発明は、HLAテトラマー法を用いることを特徴とするWT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法を提供する。なお前述のように、HLAモノマー法、HLAダイマー法およびHLAペントマー法も原理的にはHLAテトラマー法と同様の手法であり、好ましいCTLの測定法であるが、ここではHLAテトラマー法を例にとり説明する。

#### 【0022】

当該HLAテトラマーを用いたWT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法は、具体的には以下の工程（a）、（b）、（c）および（d）：

- (a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、
  - (b) WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーと、前記（a）の生体試料とを接触させる工程、
  - (c) HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、
  - (d) 前記（c）の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチン応答性を判断する工程、
- を含むものである。

#### 【0023】

ここで工程（a）における「生体試料」および「被験患者」は、前記した通りである。工程（b）において用いられる「HLAテトラマー」とは、HLA抗原の $\alpha$ 鎖と $\beta$ 2ミクログロブリンをペプチド（抗原ペプチド）と会合させた複合体（HLAモノマー）をビオチン化し、アビジンに結合させることにより4量体化したもの指す（Science 279: 2103-2106 (1998)、Science 274: 94-96 (1996)）。当該HLAテトラマーは、フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡等の公知の検出手段により結合したCTL前駆細胞を容易に選別または検出することが出来るよう、蛍光標識されていることが好ましい。具体的には、例えばフィコエリスリン（PE）、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ペリジニンクロロフィルプロテイン（PerCP）、アロフィコシアニン（APC）などにより標識されたHLAテトラマーが挙げられる。

#### 【0024】

前記HLAテトラマーの成分として用いられるWT1由来の癌抗原ペプチドは、ヒトWT1（Cell, 60:509, 1990、NCBIデータベースAccession No. XP\_034418、配列番号：1）に由来し、HLA抗原と複合体を形成してHLA拘束性の細胞傷害性T細胞（CTL）の誘導活性（免疫原性）を有するものである。

#### 【0025】

HLA分子には多くのサブタイプが存在し、結合できる癌抗原ペプチドのアミノ酸配列にはそれぞれのタイプについて規則性（結合モチーフ）が存在することが知られている（Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155:p4749, 1995）。例えばHLA-A24の場合、8~11アミノ酸からなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン（Tyr）、フェニルアラニン（Phe）、メチオニン（Met）またはトリプトファン（Trp）であり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン（Phe）、ロイシン（Leu）、イソロイシン（Ile）、トリプトファン（Trp）またはメチオニン（Met）となることが知られている（J. Immunol., 152, p3913, 1994、Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155, p4307, 1994）。

またHLA-A2のモチーフについては、以下の表1に示したモチーフが知られている（Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155:p4749, 1995）。

#### 【0026】

【表1】

HLA-A2のタイプ	N末端から2番目のアミノ酸	C末端のアミノ酸
HLA-A0201	L, M	V, L
HLA-A0204	L	L
HLA-A0205	V, L, I, M	L
HLA-A0208	V, Q	V, L
HLA-A0207	L	L

(ペプチドの長さは8~11アミノ酸)

## 【0027】

さらに近年、HLA抗原に結合可能と予想されるペプチド配列を、インターネット上、NIHのBIMASのソフトを使用することにより検索することができる ([http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/))。またBIMAS HLA peptide binding prediction analysis (J. Immunol., 152, 163, 1994) を用いて検索することも可能である。このようにして検索・同定されたWT1由来ペプチドの具体例としては、例えば国際公開第2000/18795号パンフレットのTableII~TableXLVIに列挙されたペプチドが挙げられる。

以上のようなWT1由来のペプチドは、そのアミノ酸残基の一部に改変（置換、消失、及び／又は付加（ペプチドのN末端、C末端へのアミノ酸の付加も含む））を有していても良く、好ましくはアミノ酸残基の置換が挙げられる。当該置換は前記モチーフ上とり得るアミノ酸残基への置換が望ましい。

## 【0028】

以上のようなWT1由来のペプチド（改変体も含む）を、公知の癌抗原ペプチドのアッセイ法（例えばWO 02/47474号公報、Int J. Cancer: 100, 565-570 (2002) 等参照）に供することにより、WT1由来の癌抗原ペプチドを選択することができる。

## 【0029】

WT1由来の癌抗原ペプチドの具体例としては、例えば以下のペプチドが例示される：

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2)  
 Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)  
 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)  
 Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5)  
 Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：6)  
 Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：7)  
 Abu Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：8)  
 Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：9)  
 Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：10)

## 【0030】

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：11)  
 Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：12)  
 Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号：13)  
 Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号：14)  
 Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：15)  
 Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe (配列番号：16)  
 Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe (配列番号：17)  
 Arg Tyr Pro Ser Abu Gln Lys Lys Phe (配列番号：18)

(ここでAbuは $\alpha$ -アミノ酪酸である)

## 【0031】

このうち配列番号：2および配列番号：4に記載のペプチドはHLA-A24抗原およびHLA-A2抗原に結合性のペプチドであり、またそれ以外のペプチド（配列番号：3、5、6~18）はHLA-A24抗原に結合性のペプチドである。

好ましくは、前記配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4および配列番号：5のいずれかに記載の癌抗原ペプチドが挙げられる。

## 【0032】

前記ペプチドは、1つのHLAテトラマー中に2種以上含有されていてもよい。

## 【0033】

前記ペプチドは、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて合成することができる。合成方法としては、文献（ペプタイド・シンセシス（Peptide Synthesis），Interscience, New York, 1966；ザ・プロテインズ（The Proteins），Vol 2，Academic Press Inc.，New York, 1976；ペプチド合成，丸善（株），1975；ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株），1985；医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成，広川書店，1991）などに記載されている方法が挙げられる。

## 【0034】

前記ペプチドは、そのN末端アミノ酸のアミノ基またはC末端アミノ酸のカルボキシル基を修飾したペプチドであってもよい。

ここでN末端アミノ酸のアミノ基の修飾基としては、例えば1～3個の炭素数1から6のアルキル基、フェニル基、シクロアルキル基、アシル基が挙げられ、具体的には炭素数1から6のアルカノイル基、フェニル基で置換された炭素数1から6のアルカノイル基、炭素数5から7のシクロアルキル基で置換されたカルボニル基、炭素数1から6のアルキルスルホニル基、フェニルスルホニル基、炭素数2から6のアルコキシカルボニル基、フェニル基で置換されたアルコキシカルボニル基、炭素数5から7のシクロアルコキシで置換されたカルボニル基、フェノキシカルボニル基等が挙げられる。

## 【0035】

C末端アミノ酸のカルボキシル基の修飾基としては、例えばエステル基およびアミド基が挙げられ、エステル基の具体例としては、炭素数1から6のアルキルエステル基、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキルエステル基、炭素数5から7のシクロアルキルエステル基等が挙げられ、アミド基の具体例としては、アミド基、炭素数1から6のアルキル基1つまたは2つで置換されたアミド基、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキル基1つまたは2つで置換されたアミド基、アミド基の窒素原子を含んで5から7員環のアザシクロアルカンを形成するアミド基等が挙げられる。

## 【0036】

HLAテトラマーの成分であるHLA抗原（HLA抗原の $\alpha$ 鎖）は、如何なるサブタイプのHLA抗原であっても用いることができるが、診断または選択対象のサブタイプと同じサブタイプを用いる必要がある。具体的には、例えばHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原が挙げられる。これらHLA抗原の塩基配列およびアミノ酸配列は公知であり、例えばHLA-A24抗原については Cancer Res., 55: 4248-4252 (1995) および Genbank Accession No. M64740に開示されている。またHLA-A2抗原については Genbank Accession No. M84379に開示されている。従ってこれら公知の塩基配列の情報に基づき、PCR法等の常法により、容易にHLA抗原の $\alpha$ 鎖をクローニングすることができる。

## 【0037】

当該HLA抗原の $\alpha$ 鎖は、CTLの結合性や選別性を容易にするために可溶性断片であることが好ましい。さらに、ビオチン-アビジン結合により4量体化するために、当該HLA抗原 $\alpha$ 鎖のC末端はビオチン化可能な構造を有していること、すなわちビオチン結合部位が付加されていることが好ましい。

具体的には、例えばHLA-A2402 (HLA-A24の1種) の場合は、正プライマー: 5'-CCATGGGC AGCCATTCTATGCGCTATTTTCTACCTCCGT-3' (配列番号: 19) および逆向きプライマー: 5'-GGA TCCTGGCTCCCATCTCAGGGTGAGGGGCTTGGGCAGACCCTC-3' (配列番号: 20) を用いて、HLA-A\*2402 (GenBank Acc. No. M64740) 発現プラスミドを鋳型とし、PCR反応を行うことにより、C末端タグ中の特異的リジン残基をBirA酵素でビオチニル化可能なように設計された組換え可溶性HLA-A\*2402  $\alpha$ 鎖のcDNAを得ることができる。

## 【0038】

HLAテトラマーの成分である $\beta$ 2ミクログロブリンは、ヒト由来の $\beta$ 2ミクログロブリンが好ましい。当該ヒト由来の $\beta$ 2ミクログロブリンのcDNAは、正プライマー: 5'-CATATGAT

CCAGCGTACCCCGAAAATTCAAG-3' (配列番号: 21) および逆向きプライマー: 5'-GGATCCTTACATG TCTCGATCCCCTAAC-3' (配列番号: 22) を用いて、ヒト  $\beta$  2 ミクログロブリン (GenBank Ac. No. AB021288) 発現プラスミドを鋳型とし、PCR 反応を行うことなどにより得ることができる。

#### 【0039】

HLA テトラマーの成分であるアビジンは、従来公知の如何なるアビジンであっても使用することができるが、フローサイトメトリー や 蛍光顕微鏡等による検出を容易にするために、蛍光標識されていることが好ましい。蛍光色素は、公知のものを制限なく使用することができ、例えばフィコエリスリン (PE) 、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 、ペリジニンクロロフィルプロテイン (PerCP) 、アロフィコシアニン (APC) などが挙げられる。

#### 【0040】

以上の HLA テトラマーの成分を含有する HLA テトラマーの作製法については、文献 (Science 279: 2103-2106 (1998) 、 Science 274: 94-96 (1996) 等) により周知であるが、簡単に述べると以下のようになる。

まずタンパク質を発現可能な大腸菌や哺乳動物細胞に、HLA  $\alpha$ 鎖発現ベクターおよび  $\beta$  2 ミクログロブリン発現ベクターを導入し発現させる。ここでは大腸菌 (例えば BL21) を用いることが好ましい。得られた単量体 HLA複合体と抗原ペプチド (WT1 由来の癌抗原ペプチド) とを混合し、可溶性の HLA-ペプチド複合体を形成させる。次に HLA-ペプチド複合体における HLA  $\alpha$ 鎖の C 末端部位の配列を BirA 酵素によりビオチン化する。このビオチン化された HLA-ペプチド複合体と蛍光標識されたアビジンとを 4:1 のモル比で混合することにより、HLA テトラマーを調製することができる。なお、前記各ステップにおいて、ゲルろ過等によるタンパク精製を行うことが好ましい。

#### 【0041】

前記工程 (b) は、以上のようにして作製された HLA テトラマーと、生体試料 (被験患者より単離された CTL 前駆細胞を含む生体試料) とを接触させることにより行われる。当該接触は 37°C で行うことが好ましい。また接触は、通常の生理的緩衝液、例えば血清を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中において行なうことが好ましい。

なお、HLA テトラマーの代わりに蛍光標識したストレプトアビジンを添加して同様の処理を行った陰性対照も、併せて作製しておくことが好ましい。

#### 【0042】

工程 (b) の後、HLA テトラマーに結合した WT1 特異的な CTL 前駆細胞の存在頻度または量を測定する (工程 c)。当該測定は、従来公知の如何なる手法を用いて行っても良い。HLA テトラマーが蛍光標識されている場合、この HLA テトラマーに結合した CTL 前駆細胞は蛍光標識されることになるので、フローサイトメーター、蛍光顕微鏡などを用いて標識された CTL を検出若しくは単離することができる。

#### 【0043】

HLA テトラマーに結合した WT1 特異的な CTL 前駆細胞の存在頻度は、例えば、CD8 陽性細胞 (CD8 陽性の CTL 前駆細胞) 、または CD8/CD3 陽性細胞 (CD8/CD3 陽性の CTL 前駆細胞) に対する前記 HLA テトラマー結合細胞の割合 (頻度) を測定することにより求めることができる。

ここで CD8 陽性細胞は、例えば蛍光標識したマウス抗ヒト CD8 モノクローナル抗体を用いて標識・検出することができる。また CD3 陽性細胞は蛍光標識したマウス抗ヒト CD3 モノクローナル抗体を用いて標識・検出することができる。

ここで用いる蛍光色素は、HLA テトラマーにおいて用いられる蛍光色素と異なるものを用いる必要がある。すなわち、PE 標識した HLA テトラマーを用いる場合は、FITC 標識したマウス抗ヒト CD8 モノクローナル抗体、および PerCP 標識したマウス抗ヒト CD3 モノクローナル抗体を用いるというように、蛍光色素を区別する必要がある。

#### 【0044】

具体的な操作は、CD8 陽性細胞に対する HLA テトラマー結合細胞の割合を測定する場合は

、例えばPE標識HLAテトラマーと生体試料とを接触させた後、FITC標識マウス抗ヒトCD8モノクローナル抗体をさらに添加して反応させ、染色された細胞をフローサイトメーターや蛍光顕微鏡で解析する。CD8陽性細胞 (CD8<sup>+</sup>) を選択し、その中のテトラマー陽性細胞 (CD8<sup>+</sup>tetramer<sup>+</sup>) の割合から陰性対照のアビジン陽性細胞 (CD8<sup>+</sup>avidin<sup>+</sup>) の割合を差し引いた数値を、WT1抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞の割合とすることができる（以下）：

WT1抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞 (%) =

$$[(\text{CD8}^+ \text{tetramer}^+ \text{細胞数} / \text{CD8}^+ \text{細胞数}) - (\text{CD8}^+ \text{avidin}^+ \text{細胞数} / \text{CD8}^+ \text{細胞数})] \times 100$$

【0045】

また、CD3陽性・CD8陽性細胞に対するHLAテトラマー結合細胞の割合を測定する場合は、例えばPE標識HLAテトラマーと生体試料とを接触させた後、FITC標識マウス抗ヒトCD3モノクローナル抗体及びPerCP標識マウス抗ヒトCD8抗体をさらに添加して反応させ、染色された細胞をフローサイトメーターや蛍光顕微鏡で解析する。CD3陽性およびCD8陽性細胞 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) を選択し、その中のテトラマー陽性細胞 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>tetramer<sup>+</sup>) の割合から陰性対照のアビジン陽性細胞 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>avidin<sup>+</sup>) の割合を差し引いた数値を、WT1抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞の割合とすることができる（以下）：

WT1抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞 (%) =

$$[(\text{CD3}^+ \text{CD8}^+ \text{tetramer}^+ \text{細胞数} / \text{CD3}^+ \text{CD8}^+ \text{細胞数}) - (\text{CD3}^+ \text{CD8}^+ \text{avidin}^+ \text{細胞数} / \text{CD3}^+ \text{CD8}^+ \text{細胞数})] \times 100$$

【0046】

以上の測定結果に基づき、WT1ワクチン応答性を判断する。具体的には、工程（b）で得られた被験患者におけるWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量（以下被験患者値という）を、健常人のそれ（健常人値）と比較し、両者の違いを判定することによって行うことができる。この場合、健常人から単離・調製した生体試料（血液、リンパ液、PBMC等）が必要であるが、これらは癌に罹患していない人の生体試料を採取することによって、取得することができる。なお、ここでいう「健常人」とは、癌と診断されていない人をいう。

【0047】

被験者値と健常人値との比較は、被験者の生体試料と健常人の生体試料を対象とした測定を並行して行うことで実施できる。並行して行わない場合は、複数（少なくとも2つ、好ましくは3以上、より好ましくは5以上）の健常人の生体試料を用いて均一な測定条件で測定して得られた健常人値の平均値または統計的中間値を比較に用いることができる。

【0048】

被験患者においてWT1ワクチン応答性が高いか否かの判断は、被験者値が健常人値と比較して1.5倍以上、好ましくは2倍以上多いことを指標として行うことができる。すなわち、被験者値が健常人値と比較して1.5倍以上、好ましくは2倍以上多ければ、WT1ワクチン応答性が高いと判断する。WT1ワクチン応答性が高いと判断された患者は、WT1ワクチンが適用可能、即ちWT1ワクチンによる治療を良好に適用できると判断される。

以上のような本発明の患者の選択方法は、ワクチン投与前の患者の診断のみならず、ワクチン治療後の診断や効能の確認にも使用することができる。

【0049】

本発明はまた、以下の工程（a）～（d）：

- (a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、
  - (b) 前記(a)の生体試料に複数のWT1ワクチンの標的分子をそれぞれ適用し、
  - (c) 前記(b)の生体試料中それぞれに存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定し、それぞれ比較する工程、
  - (d) 前記(c)の測定結果に基づいて、その患者に有効なWT1ワクチンの標的分子を同定する工程、
- を含む、患者固有のWT1ワクチン標的分子の同定方法を提供する。

【0050】

本発明においては、ワクチン投与前の癌患者において、従来にない高い頻度でWT1特異

的なCTL前駆細胞が存在していることを見出した。従ってWT1特異的なCTL前駆細胞の量や頻度を指標として、患者固有のWT1ワクチンの標的分子（治療用の標的分子）の同定を行うことができる。

すなわち前記標的分子の同定方法は、WT1ワクチン応答性が高いと判断された患者に対して治療上最適の標的分子（抗原ペプチド）を同定するために、有効に用いられる。

具体的には、前記WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法と同様に、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペントマー法、エリスポット法、リアルタイムRT-PCR法または限界希釈法等により、WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定することにより行われる。好ましくはHLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペントマー法が用いられる。以下HLAテトラマー法を例にとり具体的に説明する。

#### 【0051】

HLAテトラマー法は、以下の工程（a）、（b）、（c）および（d）：

- (a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、
- (b) WT1由来の複数の癌抗原ペプチドを含有する複数のHLAテトラマーと、前記(a)の生体試料とをそれぞれ接触させる工程、
- (c) HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量をそれぞれ測定し、比較する工程、
- (d) 前記(c)の測定結果に基づいて、その患者に有効なWT1由来の癌抗原ペプチドを同定する工程、  
を含んで行われる。

#### 【0052】

具体的にはまず、候補となるWT1由来癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーを複数作製する。そして、それぞれのHLAテトラマーと被験患者より単離した生体試料とを接触させ、HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する。各HLAテトラマーについての測定結果を比較し、最も高い値を示したHLAテトラマーが含有する癌抗原ペプチド（すなわち、最もCTLに認識されやすい癌抗原ペプチド）を、その患者に対するWT1ワクチン治療のための標的分子、即ち患者固有の標的分子として同定する。

#### 【0053】

ここで用いる癌抗原ペプチドは、WT1に由来する癌抗原ペプチドであれば如何なるものであっても良いが、例えば配列番号：2~18に記載の癌抗原ペプチドが挙げられる。好ましくは配列番号：2~5のいずれかに記載の癌抗原ペプチドが挙げられる。

なお、各工程の具体的な手法や成分の調製法などについては、前述のWT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法の項を参照されたい。

本発明のWT1ワクチン標的分子の同定方法によれば、患者固有の癌を処置できる標的分子が同定される。よって、本発明は別の態様として、本発明の同定方法により同定された患者固有のWT1ワクチン標的分子を含有する、患者固有の癌を処置するための当該患者用の医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物には癌ワクチンが含まれ、当業者に周知のアジュバント等を含有することができる。

#### 【0054】

本発明はまた、WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテトラマーまたはHLAペントマーを成分とする、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択のための臨床検査薬を提供する。以下HLAテトラマーを例にとり本発明の臨床検査薬につき説明する。

本発明の臨床検査薬の成分となるHLAテトラマーは、前述のようにHLA抗原の $\alpha$ 鎖と $\beta$ 2ミクログロブリンをWT1由来の癌抗原ペプチドと会合させた複合体（HLAモノマー）をビオチン化し、アビジンに結合させることにより4量体化したものを指す（Science 279: 2103-2106 (1998)、Science 274: 94-96 (1996)）。

#### 【0055】

ここで用いる癌抗原ペプチドは、WT1に由来する癌抗原ペプチドであれば如何なるもの

であっても良いが、例えば配列番号：2～18に記載の癌抗原ペプチドが挙げられる。好ましくは配列番号：2～5のいずれかに記載の癌抗原ペプチドが挙げられる。

当該HLAテトラマーの各成分の調製法やHLAテトラマーの作製法については、前述のWT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法の項に記載したとおりである。

#### 【0056】

本発明の臨床検査薬は、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択のためのキットの1成分とすることができる。当該キットは、前記本発明の臨床検査薬のみからなるキットであっても、また本発明の臨床検査薬と他の成分とを含むキットであっても良い。当該キット中の他の成分としては、蛍光標識ストレプトアビジン、蛍光標識マウス抗ヒトCD8モノクローナル抗体、蛍光標識マウス抗ヒトCD3モノクローナル抗体などが挙げられる。ここで蛍光色素としては、フィコエリスリン(PE)、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ペリジニンクロロフィルプロテイン(PerCP)、アロフィコシアニン(APC)などが挙げられる。

#### 【0057】

本発明の臨床検査薬およびキットは、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択に使用できる他、WT1ワクチンの標的分子(治療用の標的分子)の選択にも使用することができる。

#### 【0058】

本発明はまた、以下の工程(a)～(c)：

- (a) CTLを含む生体試料をWT1ワクチン投与後の患者より単離する工程、
  - (b) 前記(a)の生体試料中に存在するWT1特異的なCTLの存在頻度または量を測定する工程、
  - (c) 前記(b)の測定結果をWT1ワクチン投与前のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチンによる治療の適合性を判断する工程、
- を含む、該患者における該WT1ワクチンの適合性を判定する方法を提供する。

#### 【0059】

後述の実施例に示したように、WT1由来の癌抗原ペプチド(WT1ワクチン)による治療を実施中の患者におけるWT1特異的CTLの頻度を測定したところ、ペプチド投与前に対する投与後のCTL頻度の増加と治療効果とが相関していることを見出した。すなわち、WT1ペプチド投与後のWT1特異的CTLの頻度が、ペプチド投与前のCTL頻度に比して1.5倍以上増加した場合を「免疫反応陽性」と定義し、この免疫反応性と治療効果との関連性について評価した。その結果、免疫反応性と治療効果の間には正の相関関係が認められた。この結果から、前記免疫反応性(CTLの頻度や量の増加)を指標として、対象患者においてWT1ワクチンによる治療が適しているかどうかを判断できることが明らかとなつた。

すなわち本発明の判定方法は、WT1ワクチン投与を実施中の患者において、ペプチド投与による治療を続行するか否かといった治療の適合性を判定するために、有効に用いられる。

#### 【0060】

本発明の判定方法における工程(a)および(b)の具体的な操作については、前記「WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法」の項に記載した通りであり、具体的には、HLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペントマー法、エリススポット法、リアルタイムRT-PCR法または限界希釈法等により、WT1特異的なCTLの存在頻度または量を測定することにより行われる。

#### 【0061】

工程(c)におけるWT1ワクチンによる治療が適しているか否かの判断は、WT1ワクチン投与後の患者におけるWT1特異的なCTLの存在頻度または量(以下、投与後値といふ)を、WT1ワクチン投与前のそれ(以下、投与前値といふ)と比較し、両者の違いを判定することによって行うことができる。

ここで「ワクチン投与後」とは、WT1ワクチンを1回以上投与した後のどのタイミングであっても良いが、2週間間隔でのペプチド投与スケジュールの場合、1回目～5回目のWT1ワクチン投与後、より好ましくは1回目～3回目のペプチド投与後のタイミングが挙げられる

**【0062】**

WT1ワクチンによる治療が適しているか否かの判断は、WT1ワクチン投与後値が投与前値に比して1.5倍以上高いことを指標として行うことができる。すなわち、投与後値が投与前値と比較して1.5倍以上高ければ、WT1ワクチンによる治療が適していると判断する。

**【0063】**

前記CTLの測定法のうち、手法の容易さおよび精度の観点から最も好ましいのはHLAモノマー法、HLAダイマー法、HLAテトラマー法、HLAペントマー法である。以下HLAテトラマー法を例にとり説明する。

HLAテトラマー法は、以下の工程(a)、(b)、(c)および(d)：

- (a) CTLを含む生体試料をWT1ワクチン投与後の患者より単離する工程、
  - (b) WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーと、前記(a)の生体試料とを接触させる工程、
  - (c) HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTLの存在頻度または量を測定する工程、
  - (d) 前記(c)の測定結果をWT1ワクチン投与前のそれと比較して高いか否かを判定し、WT1ワクチンによる治療の適合性を判断する工程、
- を含んで行われる。

**【0064】**

ここでHLAテトラマーの成分とされるHLA抗原としては、HLA-A24抗原またはHLA-A2抗原が挙げられる。またHLAテトラマーの成分とされる癌抗原ペプチドとしては、例えばCys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)またはArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5)が挙げられる。これら配列番号2～5に記載のペプチドは全てHLA-A24結合性のペプチドであるため、前記本発明の判定法において用いられるHLAテトラマーとしては、配列番号：2～5に記載のいずれかのペプチドとHLA-A24抗原とを含有するHLAテトラマーが挙げられる。さらに配列番号：2および4に記載のペプチドはHLA-A2抗原に結合性のペプチドでもあるため、配列番号：2または4記載のペプチドとHLA-A2抗原とを含有するHLAテトラマーも挙げることができる。

**【0065】**

前記本発明の判定法においては、治療に用いたペプチドと同じペプチド、若しくは治療に用いたペプチドにより誘導されるCTLが交差反応性を示すペプチド、を含有するHLAテトラマーを用いることが好ましい。例えば患者の治療において配列番号：3に記載のペプチドを用いた場合は、配列番号：2または3に記載のペプチドとHLA-A24抗原とを含有するHLAテトラマーが有効に用いられる。

**【0066】**

本発明のHLAテトラマーを用いた判定方法における工程(a)～(c)の具体的な操作については、前記「WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法」の項に記載した通りである。また工程(d)については前述のように投与前値と投与後値との比較に基づいて判断される。

以下、本発明の判定法の具体例を示す。

**【0067】**

まず、WT1由来の癌抗原ペプチド投与前の癌患者から血液を採取し、PBMCを分離する(投与前試料)。次に、ペプチド投与による治療を実施した患者の血液を採取してPBMCを分離する(投与後試料)。これら投与前試料、投与後試料に対してHLAテトラマーを添加し、前記「WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法」の項および実施例3に記載の解析手法を用いてペプチド特異的CTLの頻度を測定・算出する。投与前試料におけるCTL頻度に比して、投与後試料におけるCTL頻度が1.5倍以上高い場合に、WT1ワクチンによる治療が適している(WT1ワクチンによる治療効果があがると期待される)と判断する。

**【0068】**

本発明はまた、WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAモノマー、HLAダイマー、HLAテ

トラマーまたはHLAペントマーを成分とする、WT1ワクチンの適合性の判定のための臨床検査薬、および当該臨床検査薬を含有するキットを提供する。当該臨床検査薬およびキットの成分については前記「WT1ワクチン応答性が高い患者の選択のための臨床検査薬」の項に記述した通りである。

#### 【実施例】

##### 【0069】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

##### 【0070】

#### 実施例1

##### 末梢血単核球の調製

HLA-A<sup>\*</sup>2402陽性の癌患者とHLA-A<sup>\*</sup>2402陽性の健常人からインフォームドコンセントを取得した後、採血をおこなった。造血器悪性腫瘍患者は18名で、その内訳は急性骨髓性白血病(AML)患者11名、急性リンパ性白血病(ALL)患者2名、慢性骨髓性白血病(CML)患者1名、骨髓異形成症候群(MDS)患者4名であった。肺癌患者は7名、HLA-A<sup>\*</sup>2402陽性の健常人は10名であった。

造血器悪性腫瘍患者は、診断時または治療経過において、骨髄および末梢血検体についてWT1遺伝子の有意な高発現が1回以上確認されている。また肺癌患者は、生体検体または摘出標本でWT1遺伝子の高発現が確認されている。

採取した血液からFicoll-Hypaqueの密度勾配遠心法により末梢血単核球(PBMC)を分離し、液体窒素中で凍結保存した。

##### 【0071】

#### 実施例2

##### HLAテトラマーの調製

WT1タンパク質の235番目から243番目の9アミノ酸から成るペプチド(配列番号：2)を用い、文献(Int. J. Cancer: 100, 565-570, 2002)に記載の方法により蛍光色素Phycoerythrin(PE)で標識したHLA-A<sup>\*</sup>2402のテトラマーを作製した。

##### 【0072】

まず、組換え可溶性HLA-A<sup>\*</sup>2402のcDNAを増幅するため、下記正プライマー：5'-CCA TGGGCAGCCATTCTATGCGCTATTTTCTACCTCCGT-3' (配列番号：19)および逆向きプライマー：5'-GGATCCTGGCTCCCATCTCAGGGTGGGGCTGGGCAGACCCTC-3' (配列番号：20)を用いて、HLA-A<sup>\*</sup>2402(GenBank Acc. No. M64740)発現プラスミドを鋳型とし、PCRを行った。逆向きプライマーは、C末端でフレームが一致するようにBirA認識配列をコードしている。増幅した断片を制限酵素NcoIおよびBamH1で切断し、pET11dベクター(Novagen社)にクローニングした。

次に、組換えヒト $\beta$ 2ミクログロブリンのcDNAを増幅するため、下記正プライマー：5'-CATATGATCCAGCGTACCCCGAAATTCAG-3' (配列番号：21)および逆向きプライマー：5'-GGATCCTTACATGTCTCGATCCCACTTAAC-3' (配列番号：22)を用いて、ヒト $\beta$ 2ミクログロブリン(GenBank Acc. No. AB021288)発現プラスミドを鋳型とし、PCRを行った。増幅した断片を制限酵素NdeIおよびBamH1で切断し、pET11aベクター(Novagen社)にクローニングした。

##### 【0073】

前記2種類のベクターを大腸菌BL21で発現させ、インクルージョンボディーの不溶画分として回収した。それぞれのインクルージョンボディーは8M尿素溶液で溶解後、リファーブルデイングバッファーで希釈し、更にペプチド(配列番号：2)を添加して可溶性のHLA-ペプチド複合体を形成させた。次にHLA-ペプチド複合体のC末端部位の配列をBirA酵素によりビオチン化し、ゲルろ過法でビオチン化されたHLA-ペプチド複合体を精製した。ビオチン化されたHLA-ペプチド複合体とPE標識されたアビジン(Molecular Probe社)を4:1のモル比で混合して、HLAテトラマーを調製した。

##### 【0074】

## 実施例 3

WT1特異的CTL前駆細胞のHLAテトラマーによる解析

実施例 1 の凍結したPBMCを解凍した直後に0.5%ウシ胎児血清 (FCS) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に $1 \times 10^6$ 個/mlで再浮遊し、実施例 2 で調製したテトラマー溶液 (500  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 2  $\mu\text{l}$ を加え、37°Cで30分間インキュベートした。陰性対照として、テトラマーの代わりにPE標識したストレプトアビジン (Becton Dickinson社) を添加し、同様に処理をした検体も用意した。その後氷中で急冷し、FITC標識マウス抗ヒトCD8モノクローナル抗体 (BD Pharmigen社) 及びPerCP標識マウス抗ヒトCD3抗体 (BD Pharmigen社) を各15  $\mu\text{l}$ 添加して、4°Cで30分間インキュベートした。染色した細胞は、0.5%FCSを含むPBSで2回遠心洗浄した後、フローサイトメーターFACSort (Becton Dickinson社) で解析した。CD3陽性及びCD8陽性の細胞 (CD3 $^+$ CD8 $^+$ ) を選択し、その選択した細胞中のテトラマー陽性細胞 (CD3 $^+$ CD8 $^+$ tetramer $^+$ ) の割合 (頻度) から陰性対照のPE標識ストレプトアビジン陽性細胞 (CD3 $^+$ CD8 $^+$ avidin $^+$ ) の割合を差し引いた数値をWT1抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞の割合とした：

WT1抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞 (%) =

$$[(\text{CD3}^+ \text{CD8}^+ \text{tetramer}^+ \text{細胞数} / \text{CD3}^+ \text{CD8}^+ \text{細胞数}) - (\text{CD3}^+ \text{CD8}^+ \text{avidin}^+ \text{細胞数} / \text{CD3}^+ \text{CD8}^+ \text{細胞数})] \times 100$$

【0075】

癌患者と健常人PBMCを解析した結果を表2に示す。また、この結果を疾患別にプロットしたものを図1に示す。この結果から、CD3/CD8陽性細胞中のWT1抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞の割合は、健常人では0.47~1.30%で平均が0.82%であったが、造血器悪性腫瘍患者では、1.04~29.45%で平均が5.24%、肺癌患者では0.33~5.97%で平均が2.44%であり、統計解析により健常人に比べて造血器悪性腫瘍患者及び肺癌患者では有意に増加していることが明らかとなった ( $p < 0.05$ )。

【0076】

【表2】

検体名	CTL プリカーサー頻度 (%)
急性骨髓性白血病(AML) 患者 1	8.26
急性骨髓性白血病(AML) 患者 2	8.01
急性骨髓性白血病(AML) 患者 3	5.12
急性骨髓性白血病(AML) 患者 4	3.84
急性骨髓性白血病(AML) 患者 5	4.51
急性骨髓性白血病(AML) 患者 6	3.27
急性骨髓性白血病(AML) 患者 7	2.68
急性骨髓性白血病(AML) 患者 8	2.60
急性骨髓性白血病(AML) 患者 9	1.77
急性骨髓性白血病(AML) 患者 10	1.04
急性骨髓性白血病(AML) 患者 11	1.49
急性リンパ性白血病(ALL) 患者 1	7.32
急性リンパ性白血病(ALL) 患者 2	1.78
慢性骨髓性白血病(CML) 患者	2.46
骨髓異形成症候群(MDS) 患者 1	29.45
骨髓異形成症候群(MDS) 患者 2	2.99
骨髓異形成症候群(MDS) 患者 3	2.81
骨髓異形成症候群(MDS) 患者 4	2.08
肺癌患者 1	5.97
肺癌患者 2	3.83
肺癌患者 3	2.63
肺癌患者 4	1.89
肺癌患者 5	1.69
肺癌患者 6	0.72
肺癌患者 7	0.33
健常人 1	1.30
健常人 2	1.05
健常人 3	1.08
健常人 4	0.85
健常人 5	0.81
健常人 6	0.79
健常人 7	0.61
健常人 8	0.64
健常人 9	0.57
健常人 10	0.47

## 【0077】

## 実施例4

ペプチド投与におけるWT1特異的CTLの頻度解析

以下の試験は、大阪大学医学部の倫理委員会の承認を受け、癌患者のインフォームドコンセントを得た上で実施された。

WT1の235番目から243番目までの配列のペプチド（配列番号：2）または、このペプチドのN末端から2番目のメチオニンをチロシンに置換した改変ペプチド（配列番号：3）を癌患者に1回当たり、0.3mg、1mgまたは3mg投与した。投与するペプチドはMontanide ISA 51(SEPPIC社)を用いてエマルジョン化して、1回若しくは2週間間隔で複数回皮内投与した。患者としては、HLA-A\*2402陽性およびWT1陽性である肺癌、乳癌、または白血病の患者を対象とした。

投与ペプチドに対する免疫反応は、実施例3と同様のHLAテトラマー法でペプチド特異的CTL頻度を測定して評価した。ペプチド投与後のいずれかの段階でのペプチド特異的CTL

頻度がペプチド投与前の1.5倍以上増加した場合を「免疫反応陽性」と定義した。また、ペプチド投与後に腫瘍マーカー値の低下、腫瘍細胞や腫瘍容積の減少が認められた場合を「治療効果有り」と判定した。ペプチド投与による免疫反応と治療効果がともに評価可能であった19名の癌患者について、免疫反応と治療効果の相関をカイ2乗検定により評価した。その結果、治療効果が認められた11名の患者の内、8名（73%）で免疫反応陽性であったが、治療効果の認められなかった8名の内、免疫反応陽性であったのはわずか2名（25%）のみであり、治療効果と免疫反応には有意な正の相関（ $P=0.0397$ ）が認められた。この結果より、投与ペプチド特異的なCTLの誘導は、治療効果にとって重要なファクターであることが示された。またペプチド投与による治療が順調に進んでいることの確認や、ペプチド投与による治療を続行するか否かの判断において、前記免疫反応性が1つの指標となることが示された。

【図面の簡単な説明】

【0078】

【図1】癌患者と健常人におけるWT1特異的CTL前駆細胞の存在頻度を示すグラフである。図中、縦軸はCTL前駆体（前駆細胞）の頻度を示す。また図中、血液癌はHLA-A2402陽性の造血器悪性腫瘍患者の結果を、肺癌はHLA-A2402陽性の肺癌患者の結果を、健常人はHLA-A2402陽性の健常人の結果をそれぞれ示す。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Haruo, Sugiyama

<120> Method for selecting a subject which is applicable to  
WT1 vaccine

<130> 193662

<150> JP 2003-184436

<151> 2003-06-27

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro  
1 5 10 15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala  
20 25 30

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr  
35 40 45

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro  
50 55 60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly  
65 70 75 80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe  
85 90 95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe  
100 105 110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe  
115 120 125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile  
130 135 140

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr  
 145 150 155 160  
 Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe  
 165 170 175  
 Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln  
 180 185 190  
 Tyr Ser Val Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser  
 195 200 205  
 Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp  
 210 215 220  
 Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln  
 225 230 235 240  
 Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser  
 245 250 255  
 Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu  
 260 265 270  
 Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile  
 275 280 285  
 His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro  
 290 295 300  
 Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys  
 305 310 315 320  
 Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys  
 325 330 335  
 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro  
 340 345 350  
 Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp  
 355 360 365  
 Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln  
 370 375 380  
 Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr  
 385 390 395 400  
 His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys

405

410

415

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val  
420 425 430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala  
435 440 445  
Leu

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 2

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu  
1 5

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 3

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu  
1 5

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 4

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu  
1 5

<210> 5  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic Peptide

<400> 5  
Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe  
1 5

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic Peptide

<400> 6  
Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu  
1 5

<210> 7  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic Peptide

<400> 7  
Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu  
1 5

<210> 8  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic Peptide  
<223> Xaa at 1 position stands for Abu.

<400> 8  
Xaa Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

<210> 9  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic Peptide

<400> 9  
Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu  
1 5

<210> 10  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic Peptide

<400> 10  
Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu  
1 5

<210> 11  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic Peptide

<400> 11  
Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu  
1 5

<210> 12  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 12

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu  
1 5

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

&lt;400&gt; 13

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu  
1 5

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

&lt;400&gt; 14

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu  
1 5

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

&lt;400&gt; 15

Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu  
1 5

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic

## Peptide

&lt;400&gt; 16

Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe  
1 5

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 17

Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe  
1 5

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic Peptide

&lt;223&gt; Xaa at 5 position stands for Abu.

&lt;400&gt; 18

Arg Tyr Pro Ser Xaa Gln Lys Lys Phe  
1 5

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:PCR Primer

&lt;400&gt; 19

ccatggcag ccattctatg cgctatttt ctacctccgt

40

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:PCR Primer

<400> 20

ggatcctggc tcccatctca gggtgagggg cttgggcaga ccctc

45

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR Primer

<400> 21

catatgatcc agcgtacccc gaaaattcag

30

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

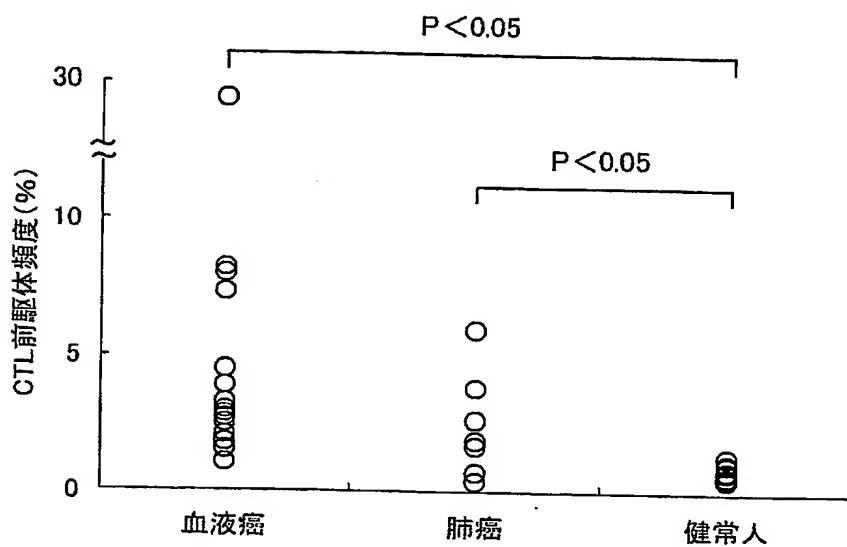
<223> Description of Artificial Sequence:PCR Primer

<400> 22

ggatccttac atgtctcgat cccacttaac

30

【書類名】図面  
【図1】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 WT 1 特異的 C T L 前駆細胞の頻度を指標とした、WT 1 ワクチン応答性が高い患者の選択方法や、その選択のための臨床検査薬などを提供すること。

【解決手段】 (a) C T L 前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、(b) 前記 (a) の生体試料中に存在するWT 1 特異的なC T L 前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、および (c) 前記 (b) の測定結果を健常人のそれと比較して高いか否かを判定し、WT 1 ワクチン応答性を判断する工程、を含む、WT 1 ワクチン応答性が高い患者の選択方法等。

【選択図】 なし

特願 2004-070497

出願人履歴情報

識別番号 [595090392]

1. 変更年月日 1995年 6月 1日

[変更理由] 新規登録

住所 大阪府箕面市船場西2-19-30  
氏名 杉山 治夫